

# Protective and adaptive responses by antioxidant flavonoids

Citation for published version (APA):

Lemmens, K. J. A. (2015). *Protective and adaptive responses by antioxidant flavonoids*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20150415kl>

## Document status and date:

Published: 01/01/2015

## DOI:

[10.26481/dis.20150415kl](https://doi.org/10.26481/dis.20150415kl)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Chapter 8

### **Summary and general discussion**

Flavonoid intake is associated with beneficial health effects. The antioxidant activity plays a crucial role in the protective action of flavonoids (**chapter 1**). The aim of this thesis was to further elaborate on the molecular mechanism of the antioxidant effect of flavonoids. The focus was put on the antioxidant, flavonoid 7-mono-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)-rutoside (monoHER), quercetin and their 4'-O-methyl metabolites.

The flavonoid monoHER is a potent protector against cardiotoxicity induced by doxorubicin. The potential relevance of the direct scavenging activity of monoHER was studied in **chapter 2**.

MonoHER protected against intracellular oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells ( $EC_{50} = 60$  nM), which confirmed the involvement of a direct scavenging activity by therapeutically achievable concentrations. This direct effect of monoHER was due to its perfect location on three levels. On a molecular level, monoHER is located at the site of radical formation where it site-specifically scavenges the radical involved. On a biochemical level, monoHER is located at a pivotal position in the antioxidant network. On a cellular level, monoHER is located in the endothelial and smooth muscle cells in the vascular wall.

This explains that monoHER displays a physiologically important direct antioxidant effect.

When ROS are scavenged, they take up an electron or a hydrogen atom from the antioxidant flavonoid. In this way the reactive species are neutralized. In contrast, the flavonoid is oxidized and becomes reactive itself. The reactivity of the oxidized flavonoid is less than that of the radical scavenged which makes it more selective. Flavonoids are reported to selectively channel the reactivity towards thiol groups. Hence, oxidized flavonoids may threaten vital cellular compounds containing a critical thiol group.

In **chapter 3** the thiol reactivity of the antioxidant flavonoid quercetin was compared to that of 4'-O-methylquercetin (tamarixetin) towards creatine kinase (CK), a vital protein that contains a critical thiol moiety. Oxidized quercetin and oxidized tamarixetin are reactive towards CK; both oxidized flavonoids adducted the enzyme,

which led to the loss of its function. Oxidized tamarixetin was less thiol toxic than oxidized quercetin, because - rather than adduction to CK - oxidized tamarixetin prefers to pass reactivity to the antioxidant network, *i.e.*, to ascorbate. Apparently, a small structural modification such as the introduction of a methyl group has a great influence on the channeling of the reactivity.

When oxidized flavonoids channel their reactivity toward the thiol containing protein KEAP1, this leads to adaptation (**chapter 4**). In **chapter 4** the effect of antioxidant flavonoid monoHER on the cellular adaptive response in HUVECs exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was studied.

It was found that oxidized monoHER adducts KEAP1, which activates the NRF2 antioxidant defense system. NRF2 is released from the KEAP1-NRF2 complex, translocates to the nucleus and upregulates the expression of antioxidant genes, *e.g.* of *HO-1*. In this way monoHER offers direct protection and induces adaptation against oxidative stress.

Thiol reactivity can lead on the one hand to toxic effects by damaging cellular compounds - as demonstrated in chapter 3 - and on other hand to a beneficial adaptive response. As shown in chapter 4, monoHER added to cells subjected to oxidative stress protects against the damage but does not reduce the adaptive response to oxidative stress while no toxicity is observed. Apparently, the protective and adaptive effect of monoHER prevails over the possible toxicity.

In **chapter 5** the effect of monoHER on oxidative stress as well as the adaptive response in the onset of NAFLD in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice on a high-fat and high-cholesterol diet was studied. Wild type mice served as a control. The effect of monoHER was compared to that of a placebo.

In the *Ldlr*<sup>-/-</sup> group, no pronounced effect of monoHER against ROS damage was seen. This could be due to the relatively large variation in the results which is probably because the onset of the disease was studied. In the placebo *Ldlr*<sup>-/-</sup> group the NRF2 antioxidant defense system was activated, evidenced by a higher *HO-1* and *Gpx3* gene expression, as well as an increased redox status, evidenced by the

higher GSH/GSSG ratio. MonoHER tended to further increase the *HO-1* and *Gpx3* gene expression and the GSH/GSSG ratio in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> group.

Surprisingly, a strong within animal relationship was found that links a relatively low redox status to an improved NRF2 activation in the monoHER *Ldlr*<sup>-/-</sup> group. This correlation was absent in the placebo and wildtype group. Apparently, monoHER administration results in a relatively potent adaptation. Based on the concept developed in this thesis, this can be explained by the thiol reactivity of oxidized monoHER, formed after scavenging. Oxidized monoHER adducts the thiol-containing protein, KEAP1 and consequently stimulates the NRF2 system. In wildtype mice monoHER did not induce the adaptive response because monoHER itself lacks the thiol reactivity.

From chapter 5 it was concluded that monoHER enforces the endogenous antioxidant shield, to provide protection against NAFLD.

In **chapter 6** the contribution of the major metabolite of monoHER, 4'-O-methylmonoHER (methylmonoHER) to the protective antioxidant effect of monoHER was investigated.

MethylmonoHER was synthesized and the antioxidant activity was evaluated and compared to that of monoHER. In the TEAC, hydroxyl and superoxide radical scavenging activity assays, methylmonoHER was far less potent than monoHER. The thiol reactivity of oxidized methylmonoHER was also less compared to that of monoHER; methylmonoHER was less reactive towards the thiol-containing proteins CK and KEAP1. These findings suggest that methylmonoHER hardly protects against radical damage via scavenging or via activating the NRF2 defense system. This was confirmed in HUVECs; monoHER which was a very potent protector ( $EC_{50} = 80$  nM) whereas methylmonoHER provided minor protection against oxidative stress ( $EC_{50} > 100$   $\mu$ M).

The results indicate that the involvement of methylmonoHER in the protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity by monoHER is relatively low.

The pharmacological effects of monoHER and the potential use as a nutraceutical were reviewed in **chapter 7**.

It was concluded that monoHER is a nutraceutical which has already been applied and of which the use can be extended in the treatment of diseases in which oxidative stress plays a crucial role. MonoHER directly protects against oxidative stress. In the direct protection against oxidative stress, monoHER is converted into a thiol reactive quinone. Interestingly, the thiol reactive quinone can adduct KEAP1 ultimately leading to an adaptive response. In this way the antioxidant monoHER selectively protects cells that are subjected to oxidative stress, which can be seen as an elegant way of targeting the protective effect of this nutraceutical.

## **Implications and future perspectives**

The research described in this thesis further unraveled the molecular mechanism of the protective effect of flavonoids i.e. monoHER, quercetin and their 4'-O-methyl metabolites. It was substantiated that flavonoids are able to protect against oxidative stress and also to promote an adaptive response.

Subjects that are still open for research are:

- the *in vivo* adaptive effect of monoHER
- the molecular mechanism behind the anti-inflammatory effect of monoHER
- the protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity by metabolites other than 4'-O-methylmonoHER
- the retention of monoHER and its metabolites in the nucleus of the endothelial cells
- the thiol reactivity/toxicity and the channeling of the reactivity of other flavonoids
- the protective and adaptive effects of other flavonoids

## **Samenvatting en algemene discussie**



De inname van flavonoïden is geassocieerd met gezondheidsbevorderende effecten. De antioxidant activiteit speelt een grote rol in de beschermende werking van flavonoïden (**hoofdstuk 1**). Het doel van dit proefschrift is het verder ontrafelen van het moleculair mechanisme achter het antioxidant effect van flavonoïden. De antioxidant flavonoïden 7-mono-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)-rutoside (monoHER), quercetine en hun 4'-O-methyl metabolieten werden bestudeerd.

Het flavonoïd monoHER geeft effectieve bescherming tegen doxorubicine geïnduceerde cardiotoxiciteit. De potentiële relevantie van het directe effect van het wegvangen van radicalen door monoHER werd bestudeerd in **hoofdstuk 2**.

MonoHER beschermt tegen intracellulaire oxidatieve stress in humane navelstreng veneuze endotheelcellen (HUVECs) ( $EC_{50} = 60$  nM). Dit bevestigt de betrokkenheid van het directe effect van het wegvangen van radicalen bij therapeutisch haalbare concentraties. Dit directe effect van monoHER komt door de perfecte locatie op 3 vlakken. Op moleculaire vlak is monoHER gelokaliseerd op de plaats waar radicalen gevormd worden. Op deze manier kan monoHER locatie-specifiek de radicalen wegvangen. Op biochemisch vlak bevindt monoHER zich op een gunstige plaats in het antioxidant netwerk. Op cellulair vlak situeert monoHER zich in endotheel- en gladde spiercellen van de veneuze wand.

Dit verklaart waarom monoHER een fysiologisch belangrijk direct antioxidant effect vertoont in de vaten.

Als de reactieve zuurstof deeltjes weggevangen worden, nemen zij een elektron of een waterstof atoom op van het antioxidant flavonoïd. Op deze manier worden de reactieve deeltjes geneutraliseerd. Daarentegen wordt het flavonoïd geoxideerd en zelf reactief. De reactiviteit van het geoxideerde flavonoïd is minder dan die van het weggevangen radicaal waardoor het selectiever wordt. Het is bekend dat flavonoïden selectief hun reactiviteit kanaliseren naar thiolgroepen. Daardoor kunnen geoxideerde flavonoïden een gevaar zijn voor fysiologisch belangrijke cellulaire moleculen die een thiolgroep bevatten.

In **hoofdstuk 3** werd de thiolreactiviteit van het antioxidant flavonoïd quercetine vergeleken met die van 4'-O-methylquercetine (tamarixetine) ten opzichte van creatine kinase (CK), een cruciaal eiwit dat een belangrijke thiolgroep bevat. Geoxideerd quercetine en geoxideerd tamarixetine zijn reactief ten opzichte van CK; beide geoxideerde flavonoïden vormen een adduct met het enzym. Dit leidt tot het verlies in functie van het enzym. Tamarixetine was minder thioltoxisch dan quercetine omdat het geoxideerde tamarixetine liever zijn reactiviteit doorgeeft aan het antioxidant netwerk, i.e. vitamine C, dan een adduct te vormen met CK. Klaarblijkelijk heeft een kleine structurele modificatie, zoals het introduceren van een methylgroep, een groot effect op het kanaliseren van de reactiviteit.

Als geoxideerde flavonoïden hun reactiviteit kanaliseren naar het thiolhoudende eiwit KEAP1, leidt dit tot adaptatie (**hoofdstuk 4**). In **hoofdstuk 4** wordt het effect bestudeerd van de antioxidant monoHER op de cellulaire adaptieve respons in HUVECs blootgesteld aan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Er werd aangetoond dat monoHER een adduct vormt met KEAP1, dat vervolgens het NRF2 antioxidant beschermingssysteem activeert. NRF2 wordt vrijgemaakt uit het KEAP1-NRF2 complex, transloceert naar de kern en induceert de expressie van antioxidant genen, b.v. *HO-1*. Op deze manier biedt monoHER directe bescherming en induceert het adaptatie tegen oxidatieve stress.

Thiolreactiviteit kan aan de ene kant leiden tot toxische effecten door het beschadigen van cellulaire componenten, zoals beschreven in hoofdstuk 3, en aan de andere kant tot een voordelige adaptieve respons. Zoals aangetoond in hoofdstuk 4, beschermt monoHER cellen blootgesteld aan oxidatieve stress tegen schade en reduceert het de adaptieve respons tegen oxidatieve stress niet terwijl er geen toxiciteit veroorzaakt wordt. Het beschermende en adaptieve effect via thiol adductvorming van monoHER treedt blijkbaar eerder op dan de mogelijke thioltoxiciteit.

In **hoofdstuk 5** werd het effect van monoHER bestudeerd op de oxidatieve stress en de adaptieve respons in het beginstadium van NAFLD in *Ldlr*<sup>-/-</sup> muizen op een hoog vet en hoog cholesterol dieet.

In de *Ldlr*<sup>-/-</sup> groep was er geen uitgesproken effect van monoHER op de schade door reactieve zuurstof deeltjes. Dit kan verklaard worden door de relatief grote variatie in de resultaten die waarschijnlijk veroorzaakt wordt doordat het beginstadium van de ziekte bestudeerd wordt. In de placebo *Ldlr*<sup>-/-</sup> groep werd het NRF2 antioxidant beschermingssysteem geactiveerd, aangetoond door een hogere *HO-1* en *Gpx3* genexpressie en een verhoogde redox status, aangetoond door een hogere GSH/GSSG ratio. MonoHER neigde de *HO-1* en *Gpx3* genexpressie en de GSH/GSSG ratio te verhogen in de *Ldlr*<sup>-/-</sup> groep.

Opmerkelijk was dat er een sterke relatie werd gevonden tussen een lage redox status en een verhoogde NRF2 activatie in de monoHER *Ldlr*<sup>-/-</sup> groep. Deze correlatie was afwezig in de placebo en wildtype groep. Blijkbaar resulteert de toediening van monoHER tot een relatieve effectieve adaptatie. Gebaseerd op het concept ontwikkeld in dit proefschrift, kan dit verklaard worden door de thiolreactiviteit van het geoxideerd monoHER, gevormd na het wegvangen van radicalen. Geoxideerd monoHER vormt een adduct met het thiolhoudende eiwit, KEAP1 en vervolgens wordt het NRF2 systeem geactiveerd. In de wildtype muis induceerde monoHER de adaptieve respons niet omdat monoHER zelf die thiolreactiviteit niet bezit.

Uit **hoofdstuk 5** kan geconcludeerd worden dat monoHER het endogene antioxidantstelsel versterkt en op deze manier bescherming biedt tegen NAFLD.

In **hoofdstuk 6** werd de bijdrage van de belangrijkste metabool van monoHER, 4'-O-methylmonoHER (methylmonoHER) aan het beschermende antioxidant effect van monoHER bestudeerd.

MethylmonoHER werd gesynthetiseerd en de antioxidant activiteit geëvalueerd en vergeleken met die van monoHER. De TEAC-waarde van methylmonoHER was lager dan die van monoHER en ook in het wegvangen van hydroxyl en superoxide radicalen was methylmonoHER veel minder effectief dan monoHER. De

thiolreactiviteit van geoxideerd methylmonoHER was minder dan die van monoHER; methylmonoHER was minder reactief ten opzichte van de thiolhoudende eiwitten CK en KEAP1. Deze bevindingen suggereren dat methylmonoHER amper bescherming biedt tegen radicaalschade via het wegvangen en het activeren van het NRF2 beschermingssysteem. Dit werd bevestigd in HUVECs; monoHER biedt zeer effectieve bescherming ( $EC_{50} = 80 \text{ nM}$ ) tegen oxidatieve stress maar methylmonoHER gaf zeer weinig bescherming ( $EC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

De resultaten wijzen erop dat de bijdrage van methylmonoHER in de bescherming tegen de doxorubicine geïnduceerde cardiotoxiciteit door monoHER gering is.

De farmacologische effecten van monoHER en het potentiële gebruik als nutraceutical werd beschreven in **hoofdstuk 7**.

Er werd geconcludeerd dat de nutraceutical monoHER reeds lange tijd wordt toegepast bij een groot scala aan ziektes waarin oxidatieve stress een belangrijke rol speelt. MonoHER biedt directe bescherming tegen oxidatieve stress. In deze directe bescherming ontstaat er een thiolreactief product. Dit thiolreactief product vormt een adduct met KEAP1 dat uiteindelijk leidt tot een adaptieve respons. Op deze manier beschermt de antioxidant monoHER selectief cellen die blootgesteld zijn aan oxidatieve stress. Dit kan gezien worden als een elegante manier van targetting van het beschermende effect van de nutraceutical.

## **Implicaties en verder onderzoek**

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift ontrafelt het moleculaire mechanisme achter het beschermende effect van flavonoïden i.e. monoHER, quercetin en hun 4'-O-methyl metabolieten. Er werd geconcludeerd dat flavonoïden bescherming kunnen bieden tegen oxidatieve stress en dat ze de adaptieve respons kunnen stimuleren.

Interessante onderwerpen die nog verder onderzocht kunnen worden:

- de adaptieve response van monoHER *in vivo* in de mens
- het moleculaire mechanisme achter het anti-inflammatoire effect van monoHER
- de bescherming tegen de doxorubicine geïnduceerde cardiotoxiciteit door andere metabolieten dan 4'-O-methylmonoHER
- de retentie van monoHER en zijn metabolieten in de kern van endotheelcellen
- de thiolreactiviteit/thioltoxiciteit en het kanaliseren van de reactiviteit van andere flavonoïden
- het beschermende en adaptieve effect van andere flavonoïden